

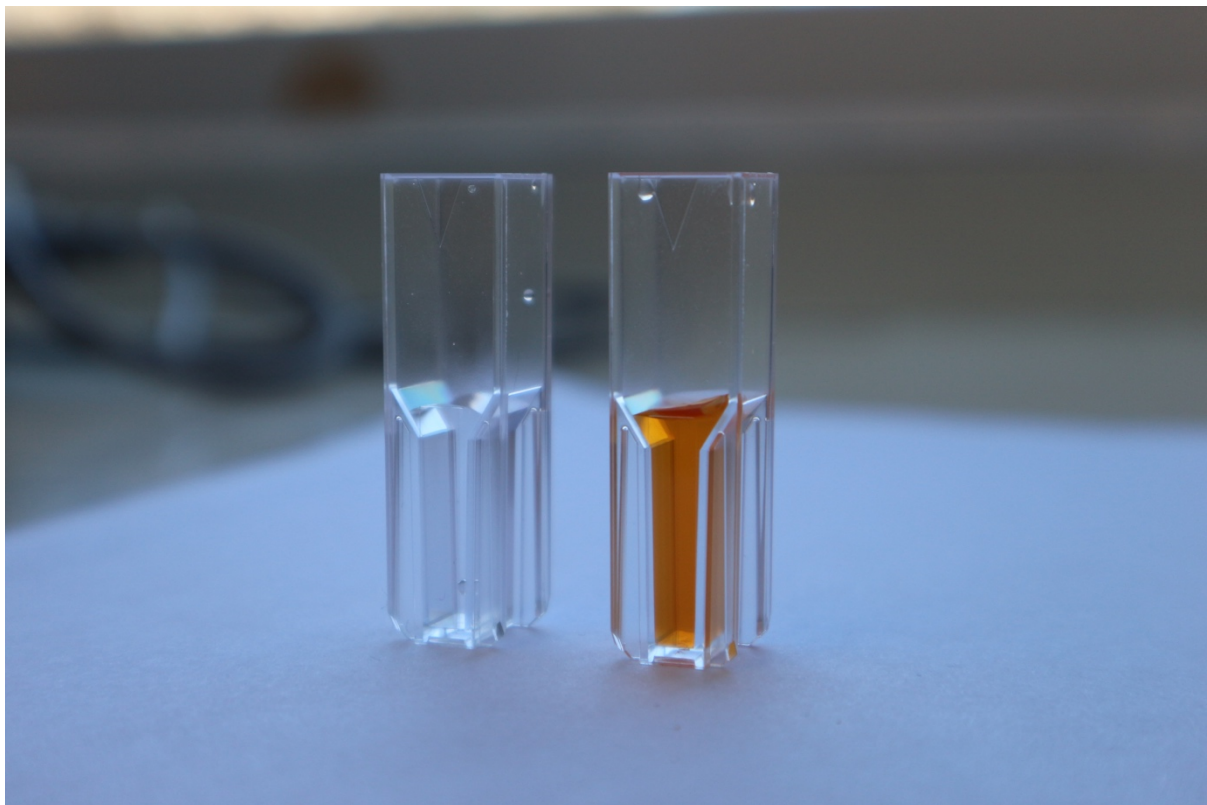
Rening av avloppsvatten med hjälp av svamp

- Hantering av läkemedel och andra mikroföroreningar med hjälp av mykoremediering

Purification of wastewater using fungi

- Removal of pharmaceuticals and other micropollutants through mycoremediation

Hannah Davidsson



Rening av avloppsvatten med hjälp av svamp

-Hantering av läkemedel och andra mikroföroreningar med hjälp av mykoremediering

Purification of wastewater using fungi

-Removal of pharmaceuticals and other micropollutants through mycoremediation

Hannah Davidsson

Handledare: Malin Hultberg, SLU, Institutionen för biosystem och teknologi

Examinator: Håkan Asp, SLU, Institutionen för biosystem och teknologi

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i biologi, G2E

Kurskod: EX0855

Program/utbildning: Hortonomprogrammet

Utgivningsort: Alnarp

Utgivningsår: 2020

Omslagsbild: Hannah Davidsson

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Avloppsvatten, rening, mikroföroreningar, mykoremediering, svamp, reningsverk, lackas.

SLU, Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap

Institutionen för biosystem och teknologi

Sammanfattning

Dagens reningsverk kan inte hantera de flesta läkemedelsrester och andra mikroföroreningar som kommer till reningsverket vilket resulterar i att de återfinns i våra akvatiska miljöer. Därför pågår mycket forskning kring hur mikroföroreningar kan hanteras och avlägsnas innan de kommer till recipienten. Detta arbetet är indelat i en litteraturstudie samt en empirisk undersökning. Syftet med arbetet har varit att undersöka hur reningsverken ser ut idag, varför de inte är tillräckligt effektiva vid eliminering av läkemedel och andra mikroföroreningar, om mykoremediering (rening med hjälp av svamp) kan vara en möjlighet för avancerad rening av läkemedelsrester i avloppsvatten samt vad konsekvenserna blir på miljön på grund av den ineffektiva reningen i reningsverken. Vidare har syftet varit att undersöka hur mycket av enzymet lackas som kan utvinnas ur en viss mängd substrat koloniserat av ostronskivling genom ett experiment. Resultatet visar att enzymet lackas, som utsöndras av de vitrötesvampar som används vid mykoremediering, kan påverka strukturen/bryta ner flertalet olika mikroföroreningar och oskadliggöra dessa. Svampar kan även hantera mikroföroreningar genom att absorbera eller adsorbera dessa och därmed frigöra avloppsvattnet från föroreningar. Substratet är billigt och det krävs ingen extern energi förutom födan/substratet för svampen vilket ofta innebär döda växtdelar. Experimentet visade mängden lackas som producerades av ostronskivling och genom beräkningar kunde mängden substrat som krävs (med bestämd enzymaktivitet) för att hantera en kubikmeter avloppsvatten beräknas. Studien visar att mykoremediering är en metod som fortfarande är under utveckling men visar stor potential för att så småningom implementeras i reningsverken för avancerad rening av avloppsvatten.

Abstract

Today's wastewater treatment plants are unable to clean wastewater of most micropollutants, including pharmaceuticals that pass the treatment plant. This results in the presence of these substances in our aquatic environments. This essay is divided into two parts, a literature study and an experimental analysis. The aim of this study was to investigate how wastewater treatment plants operate, why they are inefficient at eliminating pharmaceuticals and other micropollutants, if mycoremediation could be an effective method for advanced purification of pharmaceuticals in wastewater and finally, what the consequences for the environment caused by the ineffective purification in the treatment plants are. Further, the aim has been to examine to what degree the enzyme laccase can be secreted from a specific amount of substrate colonized by oyster mushroom through an experiment. The result indicates that the enzyme laccase, secreted by the white rot fungi which are used for mycoremediation, has the ability to alter or degrade the structures of different micropollutants, making them harmless. Another way for fungi to handle micropollutants is to absorb or adsorb these from the contaminated wastewater and thereby freeing the water from pollutants. The substrate is cheap and the method requires no external energy except for the fungal feed which usually consists of dead plant material. From the experiment we calculated the amount of laccase produced by the oyster mushroom and the amount of substrate required to treat one cubic meter of wastewater (while maintaining enzyme activity above a specific level). This study shows that mycoremediation is a method which is still under development, although it indicates that the implementation of mycoremediation into wastewater treatment plants for advanced purification is not too far away.

Innehållsförteckning

Inledning	6
Syfte och frågeställning	8
Bakgrund.....	9
Hur fungerar ett reningsverk?.....	9
Mekanisk rening.....	9
Biologisk rening.....	9
Kemisk rening.....	9
Mikroföroreningar.....	10
Vitrötesvampar	10
Material och metod	12
Litteraturundersökning.....	12
Experimentellt arbete	12
Mikroorganismen och dess odling.....	12
Extraktion av enzym.....	13
Analys.....	14
Resultat.....	15
Metoder för att hantera mikroföroreningar.....	15
Aktivt kol	15
Ozon	16
Membranfiltrering.....	16
Mykoremediering	16
Mikroföroreningar i miljön på grund av ineffektiv avloppsvattenrening.....	18
Lackas-produktion av <i>Pleorotus ostreatus</i>	19
Diskussion.....	22
Litteraturstudie	22
Experimentellt arbete	26
Slutsats.....	28
Referenser.....	29

Inledning

Det släpps idag ut många olika typer av mikroföroreningar som en konsekvens av det vardagliga livet. Nya svårnedbrytbara ämnen börjat användas i högre utsträckning och de traditionella reningsverken är inte byggda för att hantera dessa. Rester från flera olika typer av produkter återfinns därför i miljön. Sverige har en mycket bra och effektiv vattenrening där organiskt material och växtnäringssämnen tas bort och är idag ett av de länder där intensiv forskning och utvecklingsarbete inom området pågår (Cimbritz *et al.* 2016). Trots detta är inte de svenska reningsverken tillräckligt effektiva vid eliminering av mikroföroreningar. Mikroplaster, ftalater, läkemedel, flamskyddsmedel och fenolära och högfluorerade ämnen är några av de mikroföroreningar som kan hittas i avloppsvattnet (Baresel *et al.* 2017a). Dessa ämnen ansamlas i akvatiska miljöer och effekten av dessa både i låga koncentrationer och över lång tid, samt effekten de olika substanserna ger tillsammans är relativt outforskat (Sundin *et al.* 2017). Skadliga effekter av mikroföroreningar har observerats på djurlivet både i recipienter (avrinningsområde för renat avloppsvatten) och i laboratoriestudier och flera studier som påvisar mikroföroreningars skadliga effekter har publicerats. Exempelvis har en studie visat att olika fiskarters fertilitet har påverkats av de syntetiska steroiderna etinylestradiol och levonorgestrel vid mycket låga koncentrationer (Cimbritz *et al.* 2016). En annan studie som gjordes på hanfiskar som hölls i bur nedströms från ett engelskt reningsverk visade att hanarna började producera ett protein som normalt endast återfinns hos fertila honor (Purdom *et al.* 1994).

En av de stora grupperna av föroreningar som släpps ut är rester från läkemedel. Läkemedel återfinns i avloppsvattnet huvudsakligen på grund av humankonsumtion och det finns idag cirka 2000 aktiva läkemedelssubstanser på marknaden för humanmedicin (Sundin *et al.* 2017). Läkemedelsrester kommer till avloppsvatten via urin och avföring i form av vattenlösliga metaboliter som människan bildat i kroppen (Baresel *et al.* 2017b) och en hög andel av de aktiva läkemedelssubstanser som används förväntas hittas i avloppsvatten och i vattenmiljön (Cimbritz *et al.* 2016) på grund av icke-effektiv rening i reningsverken.

Studier har visat att endast 25% av de läkemedelsrester som återfinns i avloppsvattnet elimineras helt efter behandling i reningsverken och att ytterligare 25% elimineras endast till viss del efter behandling i reningsverken. Det betyder att de resterande 50% av de läkemedelsrester som finns i avloppsvattnet inte bryts ner med de klassiska metoder som

appliceras idag (Hörsing *et al.* 2014). Processen att få bort läkemedelsrester ur avloppsvatten kräver dessutom ett stort spektrum av reningsmetoder eftersom läkemedel är en bred grupp kemiska substanser med olika strukturer och egenskaper (Hörsing *et al.* 2014).

Halten av läkemedel i miljön runt recipienten beror på flera faktorer, bland annat vattenomsättningen i recipienten, mängden läkemedel som släpps ut och de kemiska och fysikaliska effekter läkemedelssubstanserna har. Olika läkemedel har olika egenskaper och läkemedel som bioackumuleras eller är persistenta har särskilt stor påverkan. Ämnen med dessa egenskaper finns kvar väldigt länge i miljön och halter av bioackumulerande läkemedel har hittats i bland annat musslor, fisk och sjöfågel (Sundin *et al.* 2017).

Då reningsverken endast är byggda för att hantera syreförbrukande ämnen, fosfor och kväve krävs nu andra ytterligare metoder för att ta hand om de ämnen som blir kvar efter den standardiserade reningen. Vi står inför ett stort problem då mikroföroreningar som hamnar i naturen påverkar miljön och organismer negativt på flera sätt och i det här arbetet kommer användningen av svampsubstrat och hur enzymer (till exempel lackas) från detta kan användas för att rena avloppsvatten från stabila föreningar som läkemedel undersökas.

Syfte och frågeställning

Syftet med arbetet har varit att studera hur reningsverken ser ut idag samt undersöka om rening med hjälp av svamp, så kallad mykoremediering, kan användas som ett extra steg i reningsprocessen för att bryta ner läkemedelsrester i avloppsvatten. Vidare var syftet att studera hur mycket av enzymet lackas som kan utsöndras ur en viss mängd substrat, som koloniserats av ostronskivling. Följande frågeställningar formulerades.

- Hur fungerar ett reningsverk idag och varför är de inte tillräckligt effektiva vid eliminering av läkemedelsrester?
- Kan mykoremediering vara användbart i reningsverk för att eliminera läkemedelsrester från avloppsvatten?
- Vilka blir konsekvenserna av ineffektiv rening av avloppsvatten?
- Hur mycket av enzymet lackas kan utvinnas ur svampsubstrat som koloniserats av ostronskivling?

Bakgrund

Hur fungerar ett reningsverk?

Ett vattenreningsverk renar avloppsvatten och reningsprocessen består vanligen av tre steg, en mekanisk rening följt av en biologisk rening och därefter en kemisk rening. Avloppsvatten innehåller mycket organiskt material och är rikt på kväve och fosfor som måste avlägsnas för att inte bidra till syrebrist och övergödning då vattnet släpps ut i naturen. Reningsverkens utformning varierar beroende på storlek och placering och nedan följer en generell beskrivning av hur reningen av avloppsvatten kan se ut. Beskrivningen är baserad på rapporten 6766 från Naturvårdsverket (Sundin *et al.* 2017).

Mekanisk rening

I det första steget i den mekaniska reningen förs vattnet genom ett galler som befriar det inkommande avloppsvattnet från större föremål såsom papper, våtservetter, tamponger och plast. Därefter passerar vattnet ett sandfång som fångar upp skadliga partiklar. En del reningsverk har även ett tredje steg, försedimentering, där kemikalier tillsätts så att föroreningarna bildar ett slam som sedan sjunker till botten. Slammet transporteras sedan till en slamförtjockare som avlägsnar vattnet från slammet.

Biologisk rening

I den biologiska reningsprocessen som sker i flera steg renas vattnet från organiskt material och kväve med hjälp av mikroorganismer. Mikroorganismerna bryter ner det organiska materialet till koldioxid och vatten samt omvandlar kväve till kvävgas. Under processen bildas slam som sjunker till botten och detta transporteras sedan till en slamförtjockare.

Kemisk rening

Det sista steget i reningsprocessen, den kemiska reningen, är utformad för att avlägsna fosfor då avloppsvatten innehåller mycket av detta. Kemikalier i form av järnsulfat tillsätts vilket gör att flockar bestående av fosfor bildas på vattenytan. Dessa sjunker sedan till botten. Slammet förs sedan till en slamförtjockare.

Mikroföroreningar

Mikroföroreningar utgör en stor, heterogen grupp av ämnen med olika ursprung och de kan betraktas som antropogena kemikalier som återfinns i miljön i högre utsträckning än en potentiell naturlig bakgrunds nivå, dock i fortsatt låg koncentration (Kordas *et al.* 2016). I avloppsvattnet varierar koncentrationen av dessa ämnen stort, men den är vanligen mellan några nanogram/liter till några mikrogram/liter (Margot *et al.* 2015). Koncentrationen kan dock vara både betydligt högre och lägre. Gruppen består bland annat av läkemedel, flamskyddsmedel, pesticider, biocider, mikroorganismer, ftalatestrar och högfluorerade ämnen (PFAS). Det är en grupp med ämnen som uppvisar flera olika egenskaper vilket betyder att effekter av dessa i miljön är svåra att förutspå (Cimbritz *et al.* 2016).

Vitrötesvampar

Vitrötesvampar kategoriseras som de svampar som har förmågan att bryta ner lignin och cellulosa och kan kännetecknas av den ljusa färgen som kvarlämnas då ligninet bryts ner. Ligninet bryts ner av extracellulära enzymer som exempelvis lackas och olika peroxidaser (Parenti *et al.* 2013). Vitrötesvampar används ofta vid mykoremediering då enzymerna som utsöndras har låg substratspecificitet och kan bryta ner ett stort spektra av organiska molekyler (Pointing 2001). Produktionen av enzymet lackas är en av anledningarna till vitrötesvamparnas användning inom mykoremediering.

Lackas är ett lignin-modifierande enzym som utsöndras av vitrötesvampar. På grund av dess låga substratspecificitet kan dock lackas även påverka andra komplexa molekyler. (Rhodes 2014). Enzymet produceras av olika växter, bakterier och svampar och har flera olika biologiska funktioner, däribland detoxifiering, lignifiering och nedbrytning av komplexa molekyler (Margot *et al.* 2013a).

Lackaser katalyserar oxidationen av flertalet aromatiska föreningar där molekyllärt syre används som oxidationsmedel och det är framförallt föreningar som fenoler och aniliner, som har en elektrondonator-grupp, som oxideras. Det är då OH-gruppen på fenolen, respektive NH₂ -gruppen på anilinen som oxideras.

Läckas har visats påverka strukturen hos flertalet olika föreningar, däribland läkemedlet diklofenak (Margot *et al.* 2013b) som har mycket låg reningsgrad i de nuvarande metoder som används då endast 10-20% avlägsnas från avloppsvattnet (Hörsing *et al.* 2014). Andra föroreningar som läckas visats påverka är det antiinflammatoriska läkemedlet mefenamsyra, biociden triclosan samt plastadditivet bisfenol A (Margot *et al.* 2013b).

Material och metod

Litteraturundersökning

Litteraturstudien baseras delvis på vetenskapliga artiklar inom området som hittats genom sökningar i databaserna Primo och Google Scholar samt olika rapporter från Naturvårdsverket och SVU (Svenskt Vatten Utveckling).

Experimentellt arbete

I försöket undersöktes hur mycket enzym som kan ges av en bestämd mängd substrat. Enzymet i fråga kan sedan användas för att bryta ner vissa läkemedelsrester. Försöket upprepades en gång.

Mikroorganismen och dess odling

I försöket användes ostronskivling (*Pleurotus ostreatus*). Stammen köptes från Mycelia BVBA Belgien och används för kommersiell produktion med benämningen *P. ostreatus* M2191 där ympen var odlad på vetekärnor. Ett sågspånsbaserat odlingssubstrat bestående av 74% sågspån av al (2-4 mm), 24% vetekli samt 2% kalciumkarbonat, baserat på torrsvikt, har använts i försöken. Substratet hade fuktighet av 65% och pastöriserades på 65°C under 8 h innan svampen inokulerades i en mängd av 10% (torrsvikt/torrsvikt). Det inokulerade substratet odlades i 22°C under 14 dagar. Efter denna tid hade svampen vuxit genom substratet (figur 1) och substratet användes till försöket som beskrivs nedan.



Foto: Hannah Davidsson

Figur 1: Substratet koloniserat av ostronskivling

Extraktion av enzym

Substratet mixades med fosfatbuffert (pH 7), 50 g substrat till 100 ml buffert, under 15 s. Därefter hälldes mixen ner i en glaskolonn med en diameter av 2 cm och en höjd av 40 cm. Fosforbuffert tillfördes kontinuerligt, rann igenom substratet och samlades ihop i provrör som byttes var 10 min (figur 2). Extraktionen pågick mellan 0-250 minuter. Höjden av tillförd fosfatbuffert hölls mellan 34-38 cm.



Foto: Hannah Davidsson

Figur 2: Kolonn med substrat samt buffert som samlas i provrör

Analys

Mängden av enzymet lackas mättes med spektrofotometrisk metod på våglängden 468 nm (figur 3) (Parenti *et al.* 2013) över tid. Enzymaktiviteten beräknas som units (U) per liter (L) ihopsamlad buffert i varje provrör enligt Lambert Beers lag. Den ihopsamlade buffertens optiska densitet följdes också på våglängden 620 nm. Detta gjordes för att se om mängden partiklar från substratet som följde med bufferten ändrades över tid.

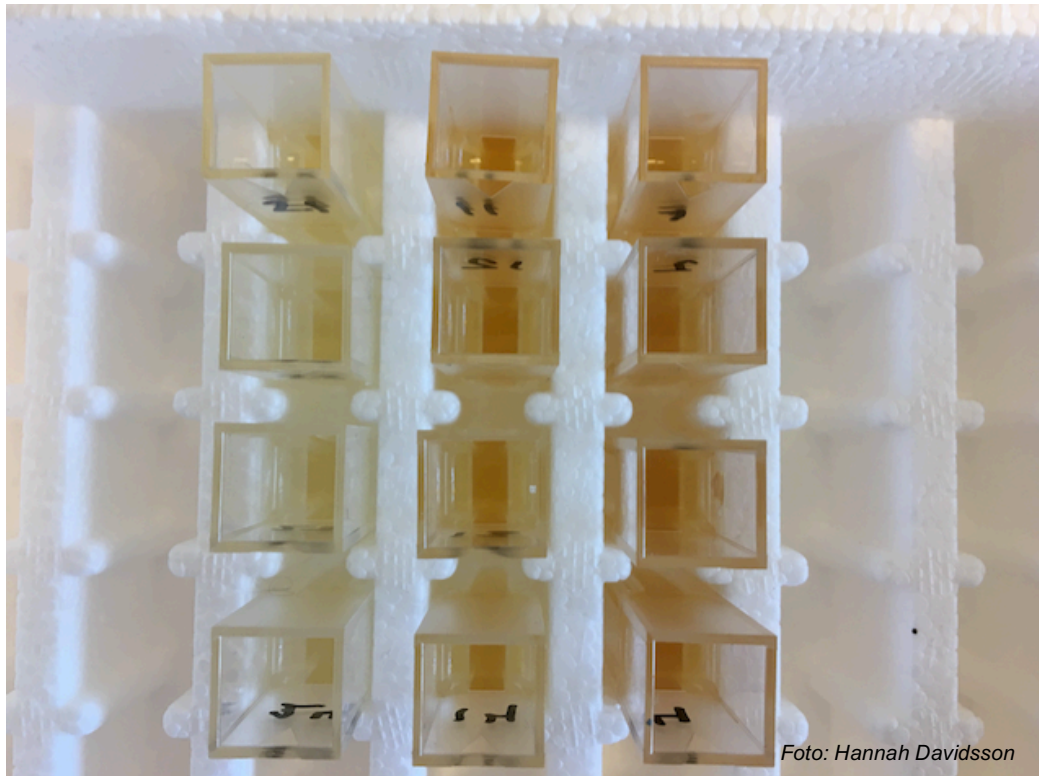


Foto: Hannah Davidsson

Figur 3: Genomrunnen buffert vid olika tidpunkter (tidsenligt från mörk till ljus orange).

Resultat

Metoder för att hantera mikroföroreningar

Då de nuvarande standardiserade reningsmetoderna i reningsverken inte renar vattnet till fullo (Sundin *et al.* 2017) har andra metoder tagits fram för att eliminera mikroföroreningar. Nedan följer exempel på ett antal metoder som används. Dessa läggs antingen till i ett sista steg eller används som kompletterande steg i den standardiserade reningen. De kan också kombineras med varandra för att uppnå eftertraktad reningsgrad. Reningsgraden av just läkemedelsrester varierar bland de olika metoderna, dock är vissa metoder istället mer effektiva mot andra typer av mikroföroreningar.

Aktivt kol

Vid behandling med aktivt kol används granulerat aktivt kol eller pulveriserat aktivt kol.

Granulerat aktivt kol (GAK) har en kornstorlek mellan 0,5-3 mm och kan rena vatten från organiska och oorganiska föreningar och den grundläggande principen är att GAK adsorberar föroreningar på den aktiva kolytan. Kolet placeras i filterbäddar i ett separat reningssteg. När kolet blivit mättat ersätts det med nytt för att bibehålla reningseffekten. Det förbrukade kolet regenereras för att användas på nytt. GAK har visat sig vara mycket effektivt för nedbrytning av läkemedelsrester (Ternes *et al.* 2002). Kolet har stor yta för adsorption och är därför väldigt effektiv vid adsorbering av olika organiska föreningar (Xing *et al.* 2008). Problem som kan uppstå vid användningen av aktivt kol vid rening är om vattnet innehåller en hög halt organiskt material och lösta partiklar då dessa adsorberas fort till aktivt kol. Förloppet medför att aktiviteten hos det aktiva kolet sänks och adsorptionsförmågan minskar vilket betyder att GAK förbrukas snabbare. Vattnet som behandlas måste därför ha låg föroreningsgrad.

Pulveriserat aktivt kol (PAK) bygger på samma principer och tillsätts vanligen i det biologiska steget i standard-reningen som ett kompletterande reningssteg (Baresel *et al.* 2017b). PAK avskiljs med slammet och kan därför medföra att slammet inte kan användas som gödningsmedel på grund av föroreningarna som via kolet koncentreras i slammet (Baresel *et al.* 2017a). Då PAK följer med slammet kan det inte regenereras utan är en förbrukningsvara.

Ozon

Vid behandling med ozon oxideras olika ämnen med hjälp av ozon och metoden är en av de mest använda vid rening av svårnedbrytbara substanser (Baresel *et al.* 2017b). Vid behandlingen används den direkta kemiska reaktionen av ozonmolekylen samt den indirekta reaktionen med hydroxylradikaler för att specifika kemiska bindningar av de berörda ämnena ska brytas. Ozonering är en flexibel metod där doserna av ozon kan kontrolleras, dock så kräver processen aktiv övervakning. Ozonering kan användas både som sista steg i reningsprocessen eller som ett mellanliggande steg mellan två biologiska steg. En signifikant nedbrytning av läkemedelsrester har observerats, dock varierar den mängd ozon som behöver tillsättas beroende på vilken substans som ska elimineras (Cimbritz *et al.* 2016).

Membranfiltrering

Vid membranfiltrering förs vattnet genom ett finporigt membran och processen integreras vanligen i standard-reningen i form av en membranbioreaktor. I en membranbioreaktor kombineras biologisk rening och avskiljning av slam från filtrerat vatten med hjälp av membranfiltrering.

En typ av membranfiltrering som används kallas ultrafiltrering och beroende på storleken av membranet kan partiklar och större lösta molekyler ner till en storlek på cirka 10 nm avskiljas. Metoden har god effekt mot både partiklar, bakterier, patogener och mikroplaster (Sundin *et al.* 2017) men sämre effekt mot ämnen lösta i vattenfasen, vilket läkemedel vanligen är. De flesta läkemedel avskiljs därför inte med membranfiltrering. Metoden används som kompletterande steg i standard-reningen eller i kombination med andra metoder som till exempel aktivt kol.

Mykoremediering

Bioremediering innebär att man biologiskt renar vatten, luft eller jord från föroreningar (Mougin *et al.* 2009). Mykoremediering är en typ av bioremediering där reningen sker mer hjälp av svamp. Svampar har förmågan att påverka olika föreningar på grund av sin

biologiska aktivitet och kan därför användas för att befria kontaminerade områden från specifika komponenter beroende på vilken art som tillförs. Mykoremediering adderas som ett extra steg i reningsprocessen hos reningsverk för att eliminera specifika föroreningar. Svampen utsöndrar enzymer och dessa kan påverka strukturen hos flera föreningar, vilket resulterar i att de kan brytas ner. En svamp som kan användas vid mykoremediering är ostronskivling.

Vitrötesvampar producerar flera olika extracellulära enzymer på grund av enzymernas förmåga att bryta ner lignin (Pointing 2001). Dessa enzymer har dock visats kunna påverka andra föreningar än lignin, däribland flertalet mikroföroreningar, vilket betyder att svampen kan etableras för att sanera mark eller vatten från de föroreningarna. Själva svampen använder sig av olika metoder för att bryta ner föreningar och bland metoderna ingår biodegradering och biosorption. Om dessa mekanismer används av människan för att skapa en produkt kallas det för bioconversion.

Biodegradering innefattar nedbrytningen av komplexa molekyler till mindre beståndsdelar och förloppet är mycket komplicerat att studera. Processen ska slutligen leda till fullständig mineralisering där produkten bryts ner till exempelvis vatten, koldioxid, nitrat eller andra oorganiska föreningar (Kulshreshtha *et al.* 2014). Det har gjorts mycket studier kring svampars förmåga att bryta ner komplexa molekyler och i laboratorium har resultat visat att enzymer från svampar kan oxidera svårnedbrytbara ämnen samt även bryta ner polymerer.

Biosorption innebär sorption (adsorption eller absorption) av föreningar/joner från avloppsvattnet till levande eller torkad biomassa som görs av svampmycel eller "spent mushroom substrate" (SMS), vilket är det jordlika material som återstår efter att svampen har odlats. Vid upptaget av föroreningar utnyttjas bioackumulering, där föreningarna genom aktiv metabolism transporteras in i cellen och i intracellulära komponenter, i kombination med biosorption där föroreningar binder till biomassan vilket inte kräver metabolisk energi. Till skillnad från levande biomassa påverkas inte död biomassa av flertalet yttre faktorer såsom pH, toxisk omgivning, näringsämnen och temperatur, vilket är varför torkad biomassa ofta används (Kulshreshtha *et al.* 2014).

Bioconversion syftar till omvandlingen av avfall till en användbar produkt. När processen innefattar svamp syftar det till kultivering av svamp på olika typer av industriellt avfall för att

sanera detta samtidigt som svampen bildas som proteinrik kulinarisk produkt (Kulshreshtha *et al.* 2014). Svamp som kultiveras på industriellt avfall kan dock medföra att fruktkroppen innehåller toxiska komponenter vilket betyder att dessa inte kan användas till mat. De toxiska nivåerna av föroreningar beror på hur dessa försvinner från substratet, biodegradering eller biosorption (Cimbritz & Mattsson 2018). Om svampen innehåller enzymer som kan bryta ner toxiska föroreningar kan substratet befrias från dessa (biodegradering), vilket betyder att fruktkroppen är säker att äta. Försvinner föroreningarna på grund av biosorption betyder det att föroreningarna återfinns i fruktkroppen som då inte kan förtäras.

Mikroföroreningar i miljön på grund av ineffektiv avloppsvattenrening

Dagens reningsverk är idag framför allt anpassade för att avlägsna syreförbrukande ämnen, kväve och fosfor och endast i låg utsträckning för de nya svårnedbrytbara ämnen som kommer till reningsverken (Cimbritz *et al.* 2016). Dessa föroreningar passerar till viss del eller helt förbi de reningsmetoder som appliceras idag (Vasquez *et al.* 2014) och följer sedan med det renade vattnet till recipienten där de kan bidra till stora negativa effekter.

Mikroföroreningarna uppvisar flera olika egenskaper och effekterna av dessa ämnen i miljön är ofta svåra att förutse och föroreningarna kan tillsammans skapa förstärkta, förminskade eller helt andra effekter än det enskilda ämnet (Sundin *et al.* 2017). Flera mikroföroreningar skapar långvariga problem vid tillförsel i recipienter. Det finns exempelvis flera olika föroreningar som bioackumuleras vilket betyder att de lagras i levande vävnad, vanligen fettvävnad, hos olika organismer. Rester av läkemedel har exempelvis hittats i bland annat fisk, musslor och sjöfågel (Sundin *et al.* 2017). Även persistenta (långlivade) ämnen är sådana som lagras upp och stannar kvar i miljön under mycket lång tid. Dessa är ofta organiska, fettlösliga ämnen där halveringstiden varierar från något år till tiotusentals år (Sundin *et al.* 2017). Ett exempel på ett persistent ämne är diklordifenyltriklorethan (DDT) (Jones & De Voogt 1999) och för DDT är halveringstiden i grundvatten cirka 31 år (Dem 2004).

De mikroföroreningar som kommer till reningsverket är ofta tillverkade för att vara stabila och svårnedbrytbara vilket gör att flertalet föroreningar kan passera reningsverken utan större påverkan (Cimbritz *et al.* 2016). Till skillnad från många andra föroreningar som hamnar i

miljön är läkemedel konstruerade för att påverka människokroppen på något sätt. Det betyder att chansen är stor att andra organismer i miljön också påverkas av dessa föreningar (Vasquez *et al.* 2014) då organismernas hormoner, receptorer och enzymer kan likna människans (Sundin *et al.* 2017). En studie som behandlar reningsgraden av läkemedel i reningsverken har visat att cirka 25% av de läkemedel som kommer till reningsverken reduceras nästan fullständigt, 25% reduceras till viss del och för de resterande 50% krävs mer avancerade reningsmetoder än de som appliceras idag för att ämnena ska reduceras (Hörsing *et al.* 2014).

Det finns flera studier som visar på olika mikroföroreningars negativa inverkan på miljön. Kontamineringen av sjöar och vattendrag med kemiska komponenter är bland de mest kritiska miljöproblemen på grund av de stora effekter föroreningarna kan ha på miljön (Sonune & Ghate 2004) och flertalet forskare har framfört att det är viktigt att införa avancerade reningssystem. Studier har visat hur fiskars fertilitet har påverkats av läkemedel och denna typen av studier lägger grund för betydelsen av införandet av avancerad rening för att skydda våra akvatiska miljöer (Cimbritz *et al.* 2016).

Lackas-produktion av *Pleorotus ostreatus*

Resultat av det utförda experimentet

Under de första 10 minuterna var kolonnen relativt löst packad och höjden av substratet var ca 31 cm. Substratet packades ihop över tid och höjden på substratet i kolonnen var 24 cm efter 50 min. Efter denna tid var packningsgraden relativt stabil och efter 100 min var substrathöjden 23,5 cm och förändrades inte.

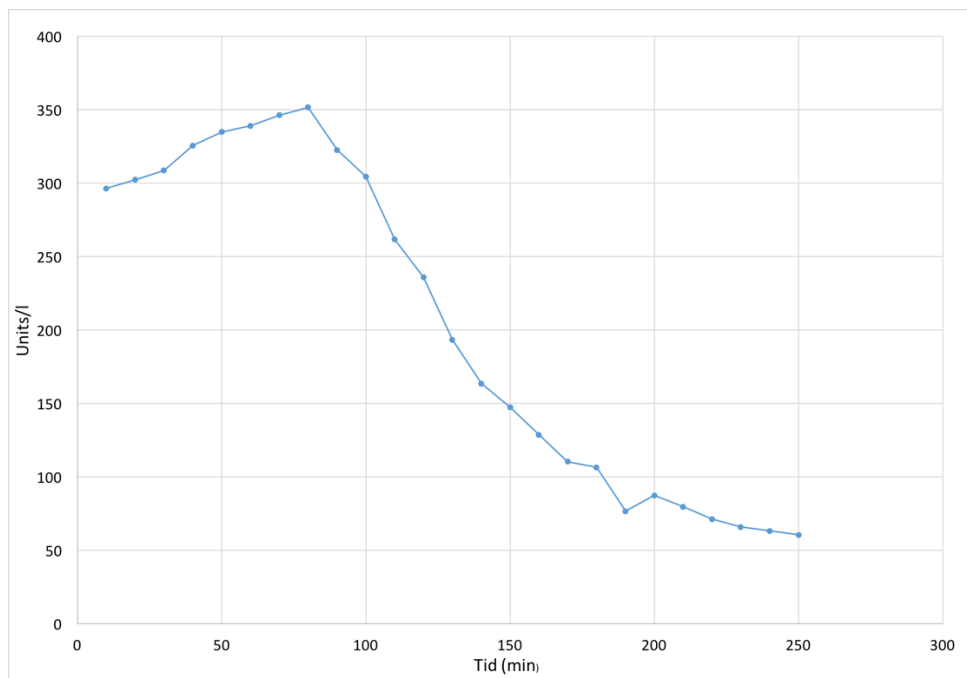
Hastigheten, mängd genomrunnen fosfatbuffert per tidsenhet, varierade med packningsgraden. Under de första 10 min rann 21 ml igenom. Mellan 10-20 min rann 11 ml igenom och mellan 20-30 min rann 9 ml igenom. Därefter var hastigheten förhållandevis stabil (30 - 250 min) och låg mellan 8,0-6,1 ml/10 min.

Lackasaktiviteten mättes i varje provrör för att få ett mått på hur aktiviteten varierade över tid (figur 4). Resultatet tar inte hänsyn till att volymen buffert i provrören varierade utan är endast ett mått på förändringen av enzymaktiviteten över tid. Variationen är dock liten och kan anses konstant efter 30 minuter.

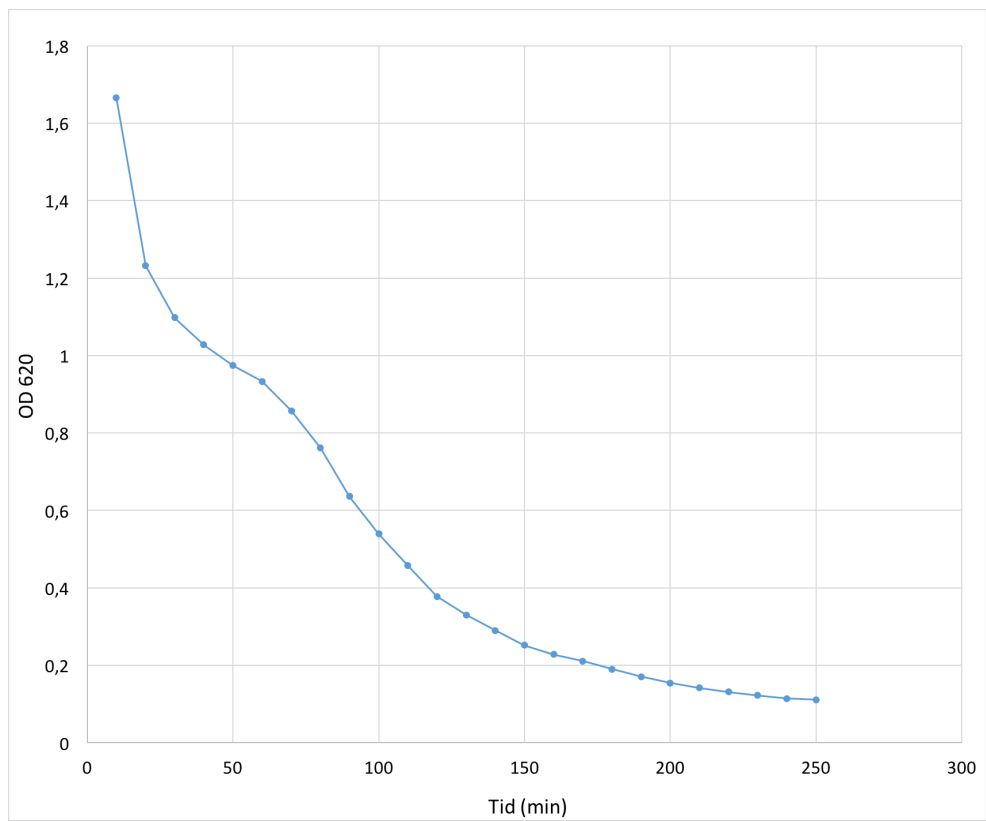
Provets optiska densitet mättes i varje provrör för att få ett mått på hur den förändrades över tid (figur 5).

Beräkning av hur mycket substrat som skulle behövas för en kubikmeter (1000L) avloppsvatten där enzymaktiviteten måste vara exempelvis över 60 U/L för att uppnå tillfredställande reningsgrad. Enzymaktiviteten är över 60 U/L i 250 min. Vid 250 minuter hade det runnit igenom 191,1 ml (0,1911 L). I kolonnen fanns 50 g (0,050 kg) substrat.

$$\frac{1000L}{0,1911L} \times 0,050 \text{ kg} = 262 \text{ kg substrat per } 1000 \text{ L avloppsvatten}$$



Figur 4: Hur enzymaktiviteten av lackas förändras över tid



Figur 5: Buffertens optiska densitet över tid

Diskussion

Litteraturstudie

Syftet med arbetet har varit att undersöka hur reningsverken ser ut idag samt se om mykoremediering är ett bra alternativ som avancerad reningsmetod för att eliminera läkemedelsrester från avloppsvatten. Frågeställningar utformades angående reningsverkens struktur och effektivitet samt kring de konsekvenser som bildas på grund av ineffektiv rening av mikroföroreningar. Som tidigare konstaterat i arbetet är inte reningsverkens nuvarande metoder tillräckligt effektiva för eliminering av läkemedelsrester och orsaken till detta är framförallt att typen av föroreningar som kommer till reningsverken har förändrats. Tidigare behövde reningsverken endast hantera syreförbrukande ämnen, kväve och fosfor och är därför byggda för att hantera just dessa (Sundin *et al.* 2017). I takt med att fler svårnedbrytbara substanser tillkom på marknaden samt förändringen av människors konsumtionsvanor har sammansättningen av ämnen som kommer till reningsverken förändrats och det behövs nya metoder för att avlägsna dessa.

Tidigare har det varit svårt att veta mängden mikroföroreningar som återfinns i avloppsvatten på grund av bristfälliga analysmetoder. Metoder för att detektera olika mikroföroreningar har nu förbättrats vilket betyder att vi nu är mer medvetna om mängden föroreningar som finns i avloppsvattnet och kan konstatera att det är ett problem som behöver hanteras. Dock är analysmetoderna för flera olika ämnen fortfarande inte tillräckligt bra, eller saknas helt, och det behövs mer forskning inom området (Baresel *et al.* 2017a).

Med kemiska analyser kan alltså mängden av olika läkemedel bestämmas i avloppsvatten. Hur enkelt olika ämnen kan analyseras varierar och det är svårare att analysera olika ämnen i avloppsvatten än i rent vatten (Cimbritz & Mattsson 2018). Studier har exempelvis visat en högre mängd läkemedel i utgående avloppsvatten än i ingående (Baresel *et al.* 2017b), vilket tyder på att metoder för analys inte är färdigutvecklade. Orsaken till de förhöjda värdena tros bero på att läkemedlet som konsumeras metaboliseras av levern genom att polära konjugat tillsätts på föroreningarna för att göra dem mer vattenlösliga. Det leder till att läkemedlet kan elimineras från blodet via filtrering i njurarna för att sedan avlägsnas med urinet. När dessa sedan kommer till reningsverket bryter bakterier bindningen till konjugatet vilket leder till att läkemedlet får sin ursprungliga form. Då analysmetoderna endast registrerar den ursprungliga strukturen av läkemedlet och inte dess metaboliter eller reaktionsprodukter verkar det som att

mer läkemedel har bildats under reningsprocessen, än vad som kom till reningsverket. En annan orsak som kan indikera ett högre värde genom reningsprocessen är mängden organiskt material som finns i avloppsvattnet (Baresel *et al.* 2017b). Organiskt material kan bland annat påverka om läkemedlet kan detekteras av mätinstrumentet genom att konkurrera om joniseringsenergin. Konkurrensen kan leda till antingen jon-suppression eller jon-förstärkning. Vid jon-suppression visas en nedtryckning av signalen vid analys på grund av konkurrensen med det organiska materialet (Magnér *et al.* 2017). Delar av det organiska materialet sänder andra signaler än det undersökta läkemedlet vilket gör att det uppfattas som en mindre mängd läkemedel i avloppsvattnet. Vid jon-förstärkning visar resultatet en högre mängd läkemedel än vad som egentligen finns i avloppsvattnet. Det organiska materialet sänder liknande signaler som läkemedlet som undersöks och därför verkar det som att det finns mer av detta i avloppsvattnet (Baresel *et al.* 2017b).

Konsekvenserna av den icke-effektiva reningen är många och som tidigare konstaterat i arbetet finns det flera studier som visar läkemedelsresters negativa inverkan på miljön (Purdom *et al.* 1994; Cimbritz *et al.* 2016; Sundin *et al.* 2017). Även här saknas det mycket kunskap och frågan är hur akvatiska miljöer som utsätts för låga koncentrationer av läkemedel över lång tid påverkas. Tidigare studier har framförallt fokuserat på akut toxicitet där ämnen orsakar så stora ekologiska förändringar att de direkt kan ses i miljön. Läkemedel är tillverkade som stabila föreningar och kan därför vara svårnedbrytbara. Det betyder att de kan påverka andra organismer vars hormoner, enzymer och receptorer liknar människans (Sundin *et al.* 2017) när de läcker ut i miljön. Exponering för dessa substanser under en längre tid kan resultera i bland annat beteendeförändring och hormonstörning hos organismer. Läkemedel i miljön riskerar även att ge andra mer sekundära effekter då de kan lagras och ackumuleras i biota samt bidra till spridningen av antibiotikaresistens.

Läkemedel och hormoner har återfunnits i flera olika djur och studier har gjorts där man kan se hur dessa har påverkat organismerna negativt. Ett av de första exemplen på negativa effekter angående läkemedelsrester i akvatiska miljöer upptäcktes av sportfiskare i England i början av 1990-talet. Sportfiskarna fick endast upp honfiskar och flera av fiskarna visades också vara tvåkönade. Effekterna kunde kopplas till vattnets innehåll av naturligt östrogen från människan samt det syntetiska östroget etinylestradiol som finns i p-piller. Detta syntetiska hormon har även hittats i uter samt visats påverka utvecklingen av äggstockarna hos groddjur (Pettersson & Berg 2007). Även andra läkemedel har visats ha en stark inverkan

på fiskar. Till exempel kan diklofenak orsaka cellförändringar hos regnbåge och ibuprofen kan påverka simaktiviteten hos märkräffa vid mycket låga koncentrationer (Sundin *et al.* 2017).

Effekter från andra läkemedel har studerats i laboratorieförsök, exempelvis där koncentrationen av antidepressiva läkemedel har varit densamma i försöket som i recipienten. I dessa försök har antidepressiva läkemedel visats påverka beteendet hos fiskar där bland annat abborrens benägenhet att gömma sig för predatorer påverkats. Orsaker där beteendet hos arter förändras kan medföra stora konsekvenser för ekosystemet, exempelvis om förändringen påverkar hur sökandet efter föda utförs. Exempel där födosök har påverkats är hos blåmussla, alger och kräftdjur där betablockeraren propranolol är orsaken till förändringen (Sundin *et al.* 2017).

Höga koncentrationer av olika läkemedel har hittats i både blåmussla och sjöfågel vilket tyder på att substanserna även förs vidare i näringskedjan (Sundin *et al.* 2017). Eftersom vissa läkemedel är persistenta kan de bioackumulera i levande organismer och ansamlas därför i dessa. Ämnena är extremt svårnedbrytbara och spridningen av dessa ämnen bör därför minimeras. Det finns gränsvärden som indikerar hur hög koncentration av specifika föroreningar som tillåts i avloppsvatten för ett fåtal grupper av mikroföroreningar, till exempel metaller och bekämpningsmedel, men sådana gränsvärden saknas för i princip alla läkemedelssubstanser (Sundin *et al.* 2017). Gränsvärdena bestäms utifrån riskerna med föroreningarna och vid en koncentration som ligger under gränsvärde ska ämnena inte ha några skadliga effekter på den akvatiska miljön (Margot *et al.* 2015).

Ett av de stora problemen som uppstår vid ineffektiv rening av läkemedel är bidraget till spridningen av antibiotikaresistens. När antibiotika återfinns i miljön, och i reningsverken, kommer det uppstå multiresistenta bakterier. Det är viktigt att dessa inte sprids. Världshälsoorganisationen (WHO) har klassat antibiotikaresistens som ett av de största hoten mot världshälsan. Detta på grund av den minskade möjligheten för sjukvården att bota bakteriella sjukdomar. Kunskapen om potentiella hälsoeffekter för människor på grund av utsläpp av läkemedel till miljön är idag bristfällig men spridning av multiresistenta bakterier kommer med stor risk blir problematiskt för människans hälsa (Sundin *et al.* 2017).

Även om flertalet konsekvenser är svåra att förutse på grund av bristen på kunskap kring olika föroreningars effekter över lång tid eller i kombination med andra är det viktigt att minimera de mikroföroreningar som finns utspridda i miljön. Om det har skett irreversibla effekter på ekosystemen kan det bli omöjligt att återställa dessa skador (Sundin *et al.* 2017). Östersjön är ett sådant exempel där skador som skett i det marina ekosystemet inte går att återställa. Den ständiga algbloomningen tros bero på att en av de viktigaste toppredatorerna, torsken, har fiskats ut (Österblom *et al.* 2007).

Det pågår alltså mycket forskning relaterat till rening av mikroföroreningar och vid dekontaminering har flera studier pekat på att mykoremediering kan vara en effektiv metod för att rena både mark och vatten från flera olika föroreningar. Vid ett försök som utfördes tillfördes mycel från ostronskivling till en jordyta kontaminerad av dieselolja. Efter fyra veckor hade flera av de polycykliska aromatiska kolvätena (PAHs) konverterat till icke-toxiska föreningar till 95% (Rhodes 2014). Svampar som kan bryta ner lignin har även visats vara mycket effektiva nedbrytare av både klorerade persistenta bekämpningsmedel samt giftiga aromatiska föroreningar från petroleum. Flera olika typer av giftiga färgämnen har även visats reducerats med hjälp av mykoremediering (Kumar *et al.* 2018). I ett medium kontaminerat med diklofenak hade närvaron av svamp reducerat mängden diklofenak med 95% på 24 timmar (Esterhuizen-Londt *et al.* 2017).

Flera studier har visat att svampar framgångsrikt har reducerat flertalet olika mikroföroreningar ur både mark och vatten och undersökningar som gjorts visar att rening med enzymer (där mykoremediering ingår) är en metod som är under utveckling för att sedan appliceras i reningsverken. Baresel *et al.* (2017) skriver:

“En kompletterande rening med enzymer kan bli ett alternativ som relativt enkelt kan implementeras i olika reningsverk då tillsats av enzymer kan ske på olika ställen i processen och kan integreras med andra reningssteg. Skräddarsydda enzymer som fokuserar på reningen av endast prioriterade läkemedelsrester ökar anpassningsmöjligheten av kompletterande rening till förutsättningar och behov vid varje reningsverk.”

I flera reningsprocesser som idag implementeras i standard-reningen för att eliminera läkemedelsrester påverkar slammet då mikroföroreningarna försvinner från avloppsvattnet genom att exempelvis bli en fällning som sjunker och tillförs till slammet. Idag används

slammet från reningsverken inom jordbruket för att återinföra näringssalter och mullämnen. Det betyder att reningsprocesser som påverkar slammet på ett negativt sätt genom att exempelvis tillföra läkemedelsrester eller andra mikroföroreningar, inte är lämpliga (Baresel *et al.* 2017a). Vid mykoremediering påverkas inte slammet då enzymerna som utsöndras endast går mot specifikt avsedda substanser och oskadliggör dessa.

Mykoremediering kräver ingen extern energi, förutom födan som krävs för svampens tillväxt (Kumar *et al.* 2018) vilket är ytterligare en fördel med mykoremediering. Flera av vitrötesvamparna som kan användas inom mykoremediering är basidiesvampar (Pointing 2001) och deras föda består framförallt av ruttnande och döda växtdelar vilket är väldigt billigt om man ser processen ur ett kostnadsperspektiv. Det behövs inte heller någon efterbehandling efter svampen då svamp är en integrerad del i miljön (det tillkommer inga toxiska komponenter eller ämnen på grund av användningen av mykoremediering) (Kumar *et al.* 2018).

Olika svampar kan användas för att eliminera olika typer av mikroföroreningar och de kan användas för olika ändamål. Ostronskivling är en svamp som kan användas för mykoremediering, men den kan även utnyttjas inom andra användningsområden. En teori som är under utveckling är att samtidigt använda ostronskivling både för rening av kontaminerad mark, men också för matproduktion (bioconversion). I en studie som gjorts undersöks ostronskivlingens förmåga att både rena samt dess kulinariska egenskaper. Odling av ostronskivling ger en möjlighet att kombinera matproduktion med rening av miljöföroreningar beroende på vilken typ av föroreningar som behandlas. Svampar som behandlar tungmetaller där metallerna absorberas och hittas koncentrerade i svampen bör inte konsumeras medan vissa organiska föroreningar i jorden kan brytas ner utan att kvarlämna toxiska komponenter (Rhodes 2014). Det skulle betyda att ett fält som är kontaminerat av den typen av föroreningar, och inte kan användas för jordbruk, både kan renas av svampen medan det också blir en skörd av en proteinrik gröda.

Experimentellt arbete

Ostronskivling (*Pleurotus ostreatus*) är en svamp som skulle kunna användas för mykoremediering då den bland annat producerar enzymet lackas som har visats kunna

oxidera och detoxifiera flertalet olika mikroföroreningar (Margot *et al.* 2013b) och det är denna svamp som har använts i försöket.

I reningsverk används i det biologiska reningssteget en biofilm som består av mikroorganismer. Vattnet passerar biofilmen och mikroorganismerna renar vattnet från framförallt organiskt material (Cimbritz & Mattsson 2018). En möjlighet skulle kunna vara om ett sådant biologiskt filter konstrueras där vattnet silas igenom svampsubstrat. Processen skulle då ske som ett sista steg i reningsprocessen då vattnet måste vara så rent som möjligt eftersom svampen endast påverkar vissa mikroföroreningar och inte andra typer av föroreningar som finns i avloppsvattnet.

Innan substratet hade packats i kolonnen rann vattnet med högre hastighet men när substratets hade packats var hastigheten konstant vilket är positivt. Det betyder att hastigheten inte avstannar med tiden vilket är nödvändigt om substratet ska användas i reningsverk.

I figur 4 visas hur enzymaktiviteten förändras över tid för en bestämd mängd substrat vilket betyder att man kan räkna ut hur ofta substratet behöver bytas ut för att processen ska upprätthålla en viss reningsgrad. Om man tänker sig att enzymaktiviteten ska vara över 60 U/L, det vill säga att man byter substratet när enzymaktiviteten går under 60 U/L kan mängden substrat som krävs för att behandla en kubikmeter (1000 L) avloppsvatten beräknas vilket visas i resultatet. Enligt detta försöket skulle det behövas ca 262 kg substrat för att behandla en kubikmeter avloppsvatten om enzymaktiviteten ska vara över 60 U/L. Mängden substrat som skulle behövas är mycket hög, dock är enzymaktiviteten betydligt högre än 60 U/L i stort sätt hela tiden. Det betyder att man hade kunnat minska mängden substrat genom att istället använda flera mindre biofilmer med svamp efter varandra som byts ut vid olika tidpunkter. Detta skulle leda till att den höga enzymaktiviteten i nyligen utbytta filter kompenserar för den lägre enzymaktiviteten i äldre filter. Denna metod medför att äldre filter kan ha en enzymaktivitet som är lägre än 60 U/L eftersom de nyligen utbytta har en enzymaktivitet som är långt över 60 U/L. På så sätt kan kurvan för enzymaktiviteten jämnas ut så att den ligger precis över 60 U/L över en längre tid vilket skulle minska substratåtgången. Exakt hur detta skulle gå till praktiskt ligger dock utanför detta arbete. 60 U/L är endast påhittade siffror och behöver egentligen inte återspegla den verkliga enzymaktiviteten som krävs för att upprätthålla en tillräckligt hög reningsgrad av olika

mikroföroreningar, utan används för att kunna beräkna hur mycket substrat som eventuellt skulle behövas.

Eftersom substratet mixades avtar enzymaktiviteten med tiden. En möjlighet är att inte mixa substratet vilket skulle betyda att hyferna inte förstörs. Då skulle man eventuellt kunna byta substratet mindre ofta men enzymaktiviteten skulle förmodligen vara lägre och det är enzymaktiviteten som är eftertraktad.

Bufferten fick en orange-liknande färg efter att den runnit igenom kolonnen. Det tyder på att partiklar från substratet följde med bufferten vilket måste vidare undersökas om processen ska implementeras i ett reningsverk. Då skulle de svamprester eller trärester som följde med undersökas om de är skadliga på något sätt. Att partiklar följde med kan dock bero på att filtret som fanns i kolonnen inte var tillräckligt finporigt och släppte igenom större partiklar från substratet. Försöket gjordes endast med en typ av filter och det är möjligt att ett annat filter skulle betyda att inga partiklar från substratet följde med det renade vattnet. Som figur 5 visar så sjönk buffertens optiska densitet med tiden vilket betyder att partiklarna som följde med vattnet är begränsade.

Slutsats

Av det jag har läst framgår det att mykoremediering visar stor potential för att snart kunna implementeras i reningsverk. Metoden är dock fortfarande i forskningsstadiet och det krävs mer kunskap inom området. Det framgår exempelvis inte i litteraturen hur implementeringen av svamp i reningsverken skulle gå till rent praktiskt, om den skulle odlas i reningsverket eller om odlingen sker utanför reningsverket och enzymer sedan extraheras och tillsätts. Men med de positiva forskningsresultat som studier har gett kan man dock konstatera att mykoremediering fungerar och flertalet mikroföroreningar kan elimineras med hjälp av denna metod. Det betyder att när vi så småningom upptäcker ett sätt för mykoremediering att implementeras i reningsverken kommer detta leda till en minskad spridning av mikroföroreningar i miljön.

Referenser

- Baresel, C., Ek, M., Ejhed, H., Allard, A.-S., Magnér, J., Dahlgren, L., Westling, K., Wahlberg, C., Fortkamp, U. & Söhr, S. (2017a). Handbok för rening av mikroföroreningar vid avloppsreningsverk.
- Baresel, C., Magnér, J., Magnusson, K. & Olshammar, M. (2017b). Tekniska lösningar för avancerad rening av avloppsvatten. *Svenska miljöinstitutet, Stockholm*,
- Cimbritz, M. & Mattsson, A. (2018). *Reningstekniker för läkemedel och mikroföroreningar i avloppsvatten: Redovisning av åtta projekt som fått medel från Havs-och vattenmiljöanslaget 2014-2017*.
- Cimbritz, M., Tumlin, S., Hagman, M., Dimitrova, I., Hey, G., Mases, M., Åstrand, N. & la Cour Jansen, J. (2016). Rening från läkemedelsrester och andra mikroföroreningar. *Stockholm, Sweden, Tech. Rep*,
- Dem, S.B. (2004). *Environmental Study of Pesticide Residues in Soil and Water from Cotton Growing Areas in Mali*. (PhD Thesis). Virginia Tech.
- Esterhuizen-Londt, M., Hendel, A.-L. & Pflugmacher, S. (2017). Mycoremediation of diclofenac using *Mucor hiemalis*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, vol. 99 (5–6), ss. 795–808 Taylor & Francis.
- Hörsing, M., Whalbeg, C., Fal'aas, P., Hey, G., Ledin, A. & Jansen, J. (2014). Reduktion av läkemedel i svenska avloppsreningsverk - kunskapssammanställning. *Svenskt Vatten Utveckling Rapport*, vol. 16
- Jones, K.C. & De Voogt, P. (1999). Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental pollution*, vol. 100 (1–3), ss. 209–221 Elsevier.
- Kordas, R., Dumbrell, A. & Woodward, G. (2016). *Large-scale ecology: model systems to global perspectives*. Academic Press.

- Kulshreshtha, S., Mathur, N. & Bhatnagar, P. (2014). Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express*, vol. 4 (1), s. 29 Springer.
- Kumar, R., Negi, S., Sharma, P., Prasher, I.B., Chaudhary, S., Dhau, J.S. & Umar, A. (2018). Wastewater cleanup using *Phlebia acerina* fungi: An insight into mycoremediation. *Journal of environmental management*, vol. 228, ss. 130–139 Elsevier.
- Magnér, J., Fång, J., Sandberg, J. & Örtlund, L. (2017). Utveckling av analysmetoder inklusive detektionsgränser. *Delrapport SystemLäk projekt. IVL Svenska Miljöinstitutet, Rapport B*, vol. 2286
- Margot, J., Bennati-Granier, C., Maillard, J., Blánquez, P., Barry, D.A. & Holliger, C. (2013a). Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. *AMB Express*, vol. 3 (1), ss. 1–14 SpringerOpen.
- Margot, J., Maillard, J., Rossi, L., Barry, D.A. & Holliger, C. (2013b). Influence of treatment conditions on the oxidation of micropollutants by *Trametes versicolor* laccase. *New biotechnology*, vol. 30 (6), ss. 803–813 Elsevier.
- Margot, J., Rossi, L., Barry, D.A. & Holliger, C. (2015). A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, vol. 2 (5), ss. 457–487 Wiley Online Library.
- Mougin, C., Boukcim, H. & Jolival, C. (2009). Soil bioremediation strategies based on the use of fungal enzymes. *Advances in Applied Bioremediation*. Springer, ss. 123–149.
- Parenti, A., Muguerza, E., Iroz, A.R., Omarini, A., Conde, E., Alfaro, M., Castanera, R., Santoyo, F., Ramírez, L. & Pisabarro, A.G. (2013). Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts. *Bioresource technology*, vol. 133, ss. 142–149 Elsevier.
- Pettersson, I. & Berg, C. (2007). Environmentally relevant concentrations of ethynylestradiol cause female-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and *Rana temporaria*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, vol. 26 (5), ss. 1005–1009 Wiley

Online Library.

Pointing, S. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 57 (1–2), ss. 20–33 Springer.

Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R. & Sumpter, J.P. (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology*, vol. 8 (4), ss. 275–285 Taylor & Francis.

Rhodes, C.J. (2014). Mycoremediation (bioremediation with fungi)–growing mushrooms to clean the earth. *Chemical Speciation & Bioavailability*, vol. 26 (3), ss. 196–198 Taylor & Francis.

Sonune, A. & Ghate, R. (2004). Developments in wastewater treatment methods. *Desalination*, vol. 167, ss. 55–63 Elsevier.

Sundin, A.M., Linderholm, L., Hedlund, B., Bly Joyce, K. & Klingspor, K. (2017). *Avancerad rening av avloppsvatten för avskiljning av läkemedelsrester och andra oönskade ämnen: Behov, teknik och konsekvenser Redovisning av ett regeringsuppdrag*. Naturvårdsverket.

Ternes, T.A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H.-J., Haist-Gulde, B., Preuss, G., Wilme, U. & Zulei-Seibert, N. (2002). Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environmental science & technology*, vol. 36 (17), ss. 3855–3863 ACS Publications.

Vasquez, M.I., Lambrianides, A., Schneider, M., Kümmerer, K. & Fatta-Kassinos, D. (2014). Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: what we know and what we should know. *Journal of hazardous materials*, vol. 279, ss. 169–189 Elsevier.

Xing, W., Ngo, H.H., Kim, S.H., Guo, W.S. & Hagare, P. (2008). Adsorption and bioadsorption of granular activated carbon (GAC) for dissolved organic carbon (DOC) removal in wastewater. *Bioresource technology*, vol. 99 (18), ss. 8674–8678 Elsevier.

Österblom, H., Hansson, S., Larsson, U., Hjerne, O., Wulff, F., Elmgren, R. & Folke, C. (2007). Human-induced trophic cascades and ecological regime shifts in the Baltic Sea. *Ecosystems*, vol. 10 (6), ss. 877–889 Springer.